

分类号\_\_\_\_\_

密级\_\_\_\_\_

U D C\_\_\_\_\_

编号\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

## 博 士 后 研 究 工 作 报 告

杉木优良无性系组培快繁及体胚发生试验研究

郑仁华

合 作 导 师：李祺福 教授

石斗开 高级工程师

郭仲琛 研究员

工作完成日期：2005 年 9 月—2008 年 8 月

报告提交日期：2008 年 10 月

厦门大学

二〇〇八年十月

# 杉木优良无性系组培快繁及体胚发生试验研究

## **RAPID PROPAGATION AND SOMATIC EMBRYOGENESIS OF SUPERIOR CLONES OF *CUNNINGHAMIA LANCEOLATA* HOOK.**

博 士 后 姓 名 郑仁华

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称 植物学

研究工作起始时间 2005 年 9 月

研究工作期满时间 2008 年 10 月

厦 门 大 学

二〇〇八年十月

## 厦门大学博士后研究工作报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（√）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：2008 年 10 月 12 日

导师签名：

日期：2008 年 10 月 18 日

## 内 容 摘 要

杉木是我国南方主要造林树种, 本文比较系统地研究了杉木优良无性系组培快繁及体胚发生技术。从杉木遗传测定林中选择出 36 株优良个体进行组培快繁技术研究, 在对 36 株杉木优良个体进行诱导、继代培养的基础上, 筛选出 5 个优良无性系进行重点研究, 建立了相应的组培快繁技术体系。诱导培养基:  $1/2MS+6-BA\ 0.3\sim 0.8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{蔗糖}\ 3\%$ ; 继代增殖培养基:  $1/2MS+6-BA\ 0.3\sim 0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+IBA\ 0.1\sim 0.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{蔗糖}\ 3\%$ ; 生根培养基:  $1/4\text{改良MS}+IBA\ 0.5\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}/NAA\ 0.5\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}/ABT^{1\#}\ 1.0\sim 1.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{蔗糖}\ 1.5\%$ ; 组培苗移栽基质: 黄心土 90%+细沙 10%。组培苗生根可达 90%, 移栽成活率可达 91%。

以杉木优良种质未成熟合子胚为外植体进行体细胞胚胎发生研究, 借助 311-A 最优回归设计等, 探讨了影响杉木体细胞胚胎发生的多种因素, 并进行相关的生理生化分析和细胞组织学观察, 以期确立高效、稳定的杉木体胚发生体系。得出如下结论:

(1)外植体的接种方式和贮藏方式均对杉木愈伤组织的诱导产生明显的影响, 其中在种子顶部切个小口的接种方式, 愈伤组织平均诱导率最高, 为 46%, 且诱导出的愈伤组织体积较大, 质量较好。冷藏处理( $4^{\circ}\text{C}$ , 1 个月)也有利于愈伤组织的诱导。

(2)外植体基因型对愈伤组织的诱导率有显著影响, 其中,  $Y21\times S27$  基因型愈伤组织的诱导率最高, 为 39.37%;  $5034\times Y27$  最低, 为 10.50%。

(3)愈伤组织的诱导率与外植体的发育阶段关系密切。6 月 25 日采摘的球果, 处于胚胎选择阶段, 诱导率最高, 为 43.33%, 其次是 7 月 2 日采摘的球果, 为 35.26%, 而 7 月 16 日采摘的球果, 诱导率只有 15.51%。

(4)运用 311-A 最优回归设计, 分析 2,4-D ( $x_1$ )、6-BA ( $x_2$ ) 与 KT ( $x_3$ ) 三个主导因子对愈伤组织诱导率的影响, 建立起杉木愈伤组织的诱导率与这三个因子之间的多项式回归方程:  $y = 0.0683 + 1.1711 * x_1 + 3.2220 * x_2 + 0.9528 * x_3 - 0.0213 * x_1 * x_1 - 0.3313 * x_2 * x_2 + 0.0275 * x_3 * x_3 + 0.0240 * x_1 * x_3 + 0.0451 * x_2 * x_3$  ( $R^2 = 0.9899$ )。并进行主效应和互作效应分析, 得出诱导培养基中植物生长调节剂最佳组合方案是  $2,4-D\ 24\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+6-BA\ 4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+KT\ 8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

(5)培养基中肌醇的浓度对愈伤组织的增殖率有极显著的影响, 当肌醇浓度从  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  提高到  $7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 增殖率由 130.92% 提升到 200.93%, 但当肌醇浓度继续加大后, 增殖率反而急剧下降到 0, 愈伤组织易发生褐变。

(6)不同植物生长调节剂种类和浓度对愈伤组织增殖的影响不同。较低的 2,4-D 浓度( $0.6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 有利于杉木愈伤组织的增殖, 增殖率为 146.26%, 而以相同浓度的 NAA 代替 2,4-D, 愈伤组织的增殖率只有 97.37%, 增殖效果不如前者。

(7)不同基因型、不同发育阶段的未成熟胚中内源  $GA_3$ 、IAA 以及 ABA 含量差别很大, 整体上这三种内源激素含量随着发育程度而有所提高, 愈伤组织的诱导率与未成熟胚中内源 ABA 和 IAA 含量呈正相关, 相关系数分别为 0.77 和 0.78。

(8)杉木胚性愈伤组织中的可溶性糖、可溶性蛋白含量和抗氧化酶活性均明显高于非胚性愈伤组织, 培养基中添加 NAA( $0.6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、ABA( $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和提高肌醇浓度( $7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 均可显著提高愈伤组织中可溶性蛋白和可溶性糖的含量, NAA( $0.6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和 ABA( $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )可刺激 SOD、POD、CAT 活性, 不同抗氧化酶对肌醇形成的渗透胁迫有不同的反应, 随着肌醇浓度的提高, SOD 活性和 POD 活性呈先上升后迅速下降, 表现出胁迫越重, 活力越低, CAT 活性则相反, 胁迫越重, 活力越高。

**关键词:** 杉木; 优良无性系; 组培快繁; 体细胞胚胎发生; 胚性愈伤组织; 311-A 最优回归设计; 生理生化差异

## Abstract

Chinese fir was an important timber tree species in south of China. Research results were reported on rapid propagation and somatic embryogenesis of superior clones of Chinese fir in relatively systematic in this paper. Tissue culture techniques of 36 plus-tree selected from Chinese fir progeny tests were researched. Among this plus-trees, 5 superior clones were systematically studied and their technique system of tissue culture were established completely. The techniques were as follows: Initial culture media was  $1/2MS + 6-BA\ 0.3\sim 0.8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{Sucrose}\ 3\%$ ; shoots proliferation induction culture media was  $1/2MS + 6-BA\ 0.5\sim 0.7\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{IBA}\ 0.1\sim 0.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{Sucrose}\ 3\%$ ; rooting culture was  $1/4\text{ improvement MS} + \text{IBA}\ 0.5\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  or  $1/2\text{ improvement MS} + \text{ABT}^{1\#}\ 1.0\sim 1.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{Sucrose}\ 1.5\%$ ; and plants rooted were transplanted in yellow-center soil 90% + fine sand 10%. Their rooting rate was up to 90%, and transplantation survival rate was up to 91%.

Based on using the excellent germplasm immature zygotic embryos as the initial explants for somatic embryogenesis research, by dint of 311-A regression Design, this thesis discussed various factors that affect somatic embryogenesis. And the physiological and biochemical differences were also analyzed in this thesis, with a view to establish efficient and stable system of somatic embryogenesis. The main experimental conclusions were as follows:

(1) Both the ways of inoculation and preservation of the initial explants had an obvious effect on inducing callus. In this trial, the highest callus induction rate was up to 46%, which was by the way of cutting a small hole on the seed capsule, and the callus it induced was larger and of better quality. Refrigeration ( $4^{\circ}\text{C}$ , one month) was also good for callus induction.

(2) The genotypes of the mother trees had a mighty significant impact on inducing callus. Among all of the genotypes, the callus induction rate of  $Y21 \times S27$  was the highest, which was 39.37%, while the rate of  $5034 \times Y27$  was the lowest, only 10.50%.

(3) The callus induction rate had a close relationship with the growth stages of the initial explants, and it was improved with the maturity of the immature zygotic embryos. The rate of the cones picked on June 25th was the highest, up to 43.33%; secondly, the cones picked on July 2nd, up to 35.26%; the last was the cones picked on July 16th, only 15.51%.

(4) Using 311 - A Regression Design to analyze the effect of 2,4-D ( $x_1$ ), 6-BA ( $x_2$ ) and KT ( $x_3$ ) on the callus induction rate, we established the polynomial regression equation between the callus induction rate and the three factors, as the following:

$$y = 0.0683 + 1.1711 * x_1 + 3.2220 * x_2 + 0.9528 * x_3 - 0.0213 * x_1 * x_1 - 0.3313 * x_2 * x_2 + 0.0275 * x_3 * x_3 + 0.0240 * x_1 * x_3 + 0.0451 * x_2 * x_3 \quad (R^2 = 0.9899)$$

By analyzing the main and mutual effects, it came to conclusion that the best medium was DCR+2,4 - D  $24\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + 6-BA\ 4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{KT}\ 8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The result was scientific as well as reasonable.

(5) The concentration of inositol in culture medium has notable impact on the rate of callus multiplication. When the concentration of inositol varied from  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , the rate was from 130.92% upgrading to 200.93%, but when it continued to increase, the multiplication rate dropped rapidly to 0,

instead. Even browning occurred.

(6) The types and concentration of hormone played a vital role in callus multiplication. In this trial, the lower the concentration of 2,4 - D was, the higher the multiplication rate was. When the concentration of 2,4 - D was  $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , the multiplication rate was up to 146.26%. While adding the NAA  $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  to the medium, the callus multiplication rate was only 97.37 %, the effect was not so good as the former.

(7) The content of  $\text{GA}_3$ , IAA and ABA of immature zygotic embryos of different genotypes and growth stages were different, respectively. As a whole, the content of the three endogenous hormone increase along with the maturity of the immature zygotic embryos. Moreover, the study found out that it took on positive correlation between the induction rate and the content of both endogenous ABA and IAA in immature embryos. Their correlative coefficient were up to 0.77 \*\* and 0.78\*\*, respectively.

(8) The content of soluble sugar, soluble protein and the activity of antioxidant enzyme in embryogenic callus were all higher than those of non-embryogenic callus. The study also found out that adding the NAA ( $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ABA ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and inositol ( $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) to culture medium could remarkably increase the content of soluble protein and soluble sugar. Both NAA ( $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and ABA ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) could stimulate the activity of SOD, POD, CAT. Different kinds of antioxidant enzymes responded to the osmotic stress of inositol, diversely. The activity of SOD increases along with the concentration of inositol advancing. So did POD. Both of them took on rise first then rapidly decline, showing the more severe stress, the lower activity. The activity of CAT, however, was opposite, showing the more severe stress, the higher activity.

**Key words:** *Cunninghamia lanceolata* Hook., Superior clone, Rapid propagation, Somatic embryogenesis, Embryogenic callus, 311-A regression design, Physiological and biochemical differences

# 目 次

1 文献综述	1
1.1 林木组培研究进展	1
1.1.1 林木组培研究概述	1
1.1.2 林木组培技术在林木繁育中的应用	1
1.1.3 杉木组培技术研究进展	4
1.2 林木体胚发生试验研究进展	4
1.2.1 林木体胚发生研究概述	4
1.2.2 针叶树体细胞胚胎发生和植株再生进展	5
1.2.3 针叶树体细胞胚胎发生及其影响因素	7
1.2.4 体胚发生过程中生理生化特性	14
1.3 本研究的目的地及意义	15
2 试验材料和方法	16
2.1 试验材料	16
2.2 试验方法	16
2.2.1 杉木优良无性系组培试验方法	16
2.2.2 杉木优良无性系组培中试生产技术体系建立	18
2.2.3 杉木体胚发生试验方法	18
3 结果与分析	25
3.1 组培诱导培养	25
3.1.1 萌芽条本身和表面灭菌方法对外植体诱导的影响	25
3.1.2 培养条件对外植体诱导和新芽生长的影响	27
3.1.3 基因型对外植体诱导和新芽生长的影响	28
3.2 组培继代增殖培养	29
3.2.1 6-BA 和 IBA 继代增殖培养的影响	29
3.2.2 NAA 对继代增殖培养的影响	30
3.2.3 大量元素对继代增殖培养的影响	30
3.2.4 光照对继代增殖培养的影响	31
3.2.5 基因型对继代增殖培养的影响	31
3.3 组培生根培养	32
3.3.1 单一生长素对生根的影响	32
3.3.2 培养基中同时添加 2 种以上生长素对生根的影响	33
3.3.3 大量元素含量和蔗糖浓度对生根的影响	34
3.3.4 基因型对生根的影响	35

3.4 组培苗移栽 .....	36
3.5 组培苗木中试生产体系的建立 .....	37
3.5.1 适合组培苗木规模化生产的杉木优良无性系筛选 .....	37
3.5.2 优良无性系组培快繁技术体系的完善 .....	39
3.5.3 组培苗木规模化生产 .....	40
3.6 体胚愈伤组织的诱导 .....	41
3.6.1 接种方式的影响 .....	41
3.6.2 种子贮藏方式和时间对其生命力及愈伤组织诱导率的影响 .....	42
3.6.3 种子基因型和球果采摘时期试验 .....	42
3.6.4 植物生长调节剂最佳浓度配比筛选试验 .....	44
3.7 体胚愈伤组织的继代与增殖 .....	48
3.7.1 肌醇影响试验 .....	48
3.7.2 植物生长调节剂种类和浓度试验 .....	48
3.7.3 抗褐变试验 .....	49
3.8 体胚成熟试验 .....	49
3.9 生理生化指标分析 .....	50
3.9.1 未成熟种子内源激素含量分析 .....	50
3.9.2 胚性和非胚性愈伤组织生理生化差异 .....	52
3.10 愈伤组织的细胞组织学观察 .....	57
4 小结与讨论 .....	57
4.1 杉木优良无性系组培快繁技术试验 .....	57
4.2 杉木优良无性系组培苗移栽试验 .....	58
4.3 杉木优良无性系组培快繁技术体系建立和中试生产 .....	59
4.4 体胚愈伤组织的诱导 .....	60
4.5 体胚愈伤组织的增殖 .....	61
4.6 体胚的成熟 .....	62
4.7 生理生化差异分析 .....	62
5 本研究存在的问题及展望 .....	63
参考文献 .....	64
致谢 .....	68
博士生期间发表的学术论文、专著 .....	69
博士后期间发表的学术论文、专著 .....	70
个人简历 .....	72
联系地址 .....	72
图版 .....	75



# 1 文献综述

## 1.1 林木组培研究进展

### 1.1.1 林木组培研究概述

无性繁殖是指利用植物细胞的全能性使植物的部分营养器官(根、茎、叶等)或组织(髓、皮层、叶肉等)以及细胞和原生质体,在适当条件下,通过体细胞的有丝分裂,分化发育成各种组织和器官,再形成完整植株的一种繁殖方法。无性繁殖的历史可追溯到远古时代,一些木本园艺植物(如葡萄)的无性繁殖已有2 000年的历史。早在16、17世纪,西方的园艺学家就掌握了木本植物扦插、嫁接、压条等无性繁殖技术,日本早在1400年以前就利用天然日本柳杉压条苗和扦插苗进行造林。组织培养作为无性繁殖中最重要的技术手段之一,是用植物的一部分组织(如形成层、花药组织、胚乳、皮层、体细胞、生殖细胞、成熟或未成熟的胚等)或器官(如根尖、茎尖、叶、花、未成熟的果实、种子等)在无菌的人工培养基上进行离体培养,以获得完整植株的无性繁殖方法。由于培养物是脱离植物母体,在试管中培养的,所以也称离体培养。植物组织培养理论是建立在植物细胞全能性基础上的。植物细胞的全能性是指植物的每个细胞都具有该植物的全部遗传信息,在一定培养条件下离体细胞具有发育成完整植株的潜在能力。植物组织培养是20世纪之初,以植物生理学为基础发展起来的一门新兴技术,这项技术已在科研和生产上得到广泛应用,成为举世瞩目的生物技术之一。该技术具有加速育种,缩短繁殖过程,改良品质,节省空间,减少劳动,周年试验生产,不受自然条件限制等特点,且组培苗的体积小,便于携带和资源交流。其主要优点是能够在短期内大量繁殖遗传基因型比较一致的优良材料,而且能充分利用繁殖材料的遗传潜能,达到最佳的效益水平,同时苗木的生产可以在室内进行,降低自然环境条件的不良影响,全年生产组培苗木,林木上桉树等用材树种已经利用优良无性系组培苗木大面积应用于营造人工林(王怀智, 1988; 陈正华, 1986; 林静芳, 1988)。

### 1.1.2 林木组培技术在林木繁育中的应用

**1.1.2.1 优良无性系苗木的扩繁** 选择优良无性系进行扩大繁殖是发挥森林潜能、提高森林生产力、促进林木速生丰产的有效措施。因而,培育大量的优质无性系苗木,建立无性系林业已成为近年来国内林木改良中的一个重要发展趋势,也体现了对用材林“速生、丰产、优质”的要求(王虹, 2004)。在林木方面,我国先后对桉树、马褂木、杉木、

火炬松、马尾松、湿地松、白皮松、油松、杉木、泡桐、杨树、桉树、海岸红杉、香果树、柏木、核桃、桃、桑等树种的组织培养进行了研究，成功地通过其器官、茎尖、成熟胚、花药和愈伤组织等诱导成苗，有些树种的组培苗已大量应用于生产。苗木扩繁的方式主要有三个：一是器官发生，器官发生方式包括直接器官发生和间接器官发生两条途径。间接器官发生指从培养的根、茎、叶和花器官等外植体先形成愈伤组织，再分化成器官的方法。直接器官发生是指不经过愈伤组织阶段，直接从原始外植体上诱导产生不定芽或不定根的过程。由于器官发生方式在经过愈伤组织分化阶段时，其体细胞突变的可能性较大，因而，该发生方式成为选育优良品种的很好途径，可作为育种手段使用；但因其变异性大，在快速繁殖中一般不采用这种方式。因此，直接器官发生方式是木本植物快繁的主要途径。二是丛生芽增殖，丛生芽增殖方式是指茎尖或初代培养的芽，在适宜的培养基上诱导，不断发生腋芽，再从芽的叶腋内长出小芽，腋芽不断形成又不断萌发，形成丛生苗，然后转入生根培养基，诱导生根成苗，扩大繁殖。由于在其增殖过程中，不经过发生愈伤组织而再生，直接从芽到芽，是最能使无性系后代保持原品种遗传特性的一种繁殖方式。这种增殖方式在数量、质量和经济等方面都优于其他传统繁殖方式。因此，它是林木快繁中运用最为广泛的一种繁殖方式。三是体细胞胚胎发生，体细胞胚是指在植物组织培养中起源于一个非合子细胞、经过胚胎发生和胚胎发育过程形成的具有双极性胚状结构(李浚明, 1992)。通过胚状体再生植株的优点是：在一个培养物上所能分生的胚状体数往往比不定芽数多，因此成苗率高。因体细胞胚具有双极性、繁殖快、遗传专一，为既能保持其母本优良品质，又对难生根的树种提供了一种很好的快繁方法。所以，体细胞胚发生是木本植物快繁的另一条有效的途径。由于其为单细胞起源，不会出现嵌合问题，胚性组织高密度、高质量，可一次获得大量植株。目前不仅是人工种子生产的重要手段，而且成为转基因植株稳定再生的主要方式(Attree SM, 1994)。

**1.1.2.2 林木品种改良及良种繁育** 组织培养是开展林木品种改良及良种繁育的主要手段，主要体现在：一是通过单倍体育种方法能获得纯系的新品种，通过林木花粉培养和未受精子房与胚珠的培养能诱导出愈伤组织，使它形成单倍体植株，然后经染色体加倍，恢复为二倍体，培育成新的品种，这就是所谓的单倍体育种。就林木来说，从种子发芽，到能开花结实一般要经历8a以上的时间，而为了获得稳定的纯系进行自交，更需要有50a以上的时间，但是如采用单倍体育种法育种，时间即可大大缩短，并且能够控制杂种分离，简化育种程序，提高选择效率。二是林木体细胞杂交研究，细胞融合可打破种属间的界限，克服远缘杂交不亲和性障碍，在植物新品种的培育和种性的改良中有

着巨大的潜力。通过原生质体融合，可部分克服有性杂交不亲和性，而获得体细胞杂种，从而创造新种或育成优良品种，这是组织培养应用最诱人的一个方面。目前已获得40余个种间、属间、甚至科间的体细胞杂种、愈伤组织，有些还进而分化成苗。经过原生质体分离、培养和融合等一系列操作，最后获得体细胞杂交植株，培育出新的优良品种。在木本植物中，已有柿、柑桔、苹果、猕猴桃、枇杷、北美鹅掌楸、欧洲山杨、毛白杨、刺槐、桉树、桑树、杏、小叶杨、悬铃木、泡桐等40余种木本植物由原生质体培养获得再生植株。三是林木遗传转化的研究，组织培养是植物分子生物学研究中不可缺少的技术手段，如转基因植株的获得。用基因工程的方法，把目标基因切割下来并通过载体使外来基因整合进林木的基因组的研究在某些林木中已获得成功，这克服了林木育种中的盲目性，而变成按人们的需要操纵林木的遗传变异，育成优良品种。詹亚光用根癌农杆菌介导法对白桦进行转化，获得了转化再生植株，卡那霉素抗性愈伤组织产生率达10%~22%，抗性不定枝的生根率达80%以上；经分子生物学检测，在卡那霉素抗性转化植株中，有34%检测出GUS活性，76.5%的卡那霉素抗性植株的Southern斑点杂交呈阳性反应。初步证明，抗虫基因已转入白桦中，目前这项研究尚未取得较大的突破。因此，要用基因工程实现林木改良，以增加产量和改善品质，是21世纪需要解决的一个问题。四是细胞突变体的筛选，大量试验表明，从细胞培养获得的遗传变异，已成为选择有用变异的一个重要新来源。利用细胞和组织培养中常发生变异的原理，可以进行突变的诱发和离体选择。无论是愈伤组织培养还是细胞培养，培养细胞均处于不断分生状态，容易受培养条件和外界环境介质(如射线、化学物质等)的影响而产生变异，从中可以筛选出对人们有用的细胞突变体，从而育成新品种。尤其对原来诱发突变较为困难、突变率较低的一些性状，用细胞培养进行诱发、筛选和鉴定时，处理细胞数远远多于常规诱变处理个体数。因此，一些突变率极低的性状有可能从中选择出来。因其突变率比自然界的突变率高出50%以上，在林木育种中，可从中筛选出对人类有用的突变体，为林木遗传改良提供丰富的遗传变异基础。目前，利用这种方法已筛选出了抗病、抗盐、高赖氨酸、高蛋白、矮秆高产的植物突变体，并应用于生产。在林木中，获得了美洲加杨、欧洲落叶松的抗溃疡病无性系、北美五针松抗锈病新品种等。五是种质资源的保存，自20世纪70年代首次报道将胡萝卜悬浮培养细胞在液氮中保存后仍可恢复生长的成果以来，美国、印度、加拿大、英国、意大利、前苏联和日本等国的有关实验室先后开展了植物组织细胞种质保存的研究，着手建立种质库，收集和保存珍贵的种质资源。刘长莉在组织培养的基础上，通过改变培养基中添加的化学物质、调节培养物生长所需的温度、光照以及封口材料，来实现试管苗的保存。

### 1.1.3 杉木组培技术研究进展

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是我国特有的用材树种,是南方各省区最重要的造林树种之一。据第四次全国森林资源清查结果,全国杉木林面积达  $9.11 \times 10^6 \text{hm}^2$ , 约占南方林区森林面积的 1/3, 年产木材占全国商品材的 1/5 (苏顺德等, 2007)。杉木生长迅速, 干形通直圆满, 材质轻而韧, 纹理美观, 加工容易, 木材芳香, 不挠、不变形, 抗蚁蛀耐腐蚀, 被广泛用于建房屋、家具、造船、制器皿等领域 (郑万钧, 1983)。随着杉木深度加工利用, 杉木木材的用途不断拓展, 再加上人们生活水平的提高, 要求居住环境回归自然, 杉木越来越受群众欢迎和喜爱, 前景广阔。杉木的无性繁殖技术研究起步于 20 世纪 70 年代, 80 年代开展了大量杉木无性系选育、扦插试验, 探索了杉木扦插生根的遗传变异规律 (施季森等, 1993; 1994; 何祯祥等, 1994)。组织培养试验研究方面, 阙国宁于 1980 年开始进行杉木组培技术试验研究, 探索了不同年龄母本上的外植体的嫩梢增殖规律和成年母本外植体的组培复壮技术 (阙国宁等, 1989)。之后众多学者从事了杉木组培技术的研究, 组培快繁技术取得了一定的进展 (诸葛强等, 1990; 1992; 吴擢溪等, 1991; 苏秀铨等, 1997; 2000; 吴大忠, 1999; 黄发新等, 2001)。但杉木的组培快繁技术还没有取得较大的突破, 特别对遗传上真正优良的无性系的快繁技术研发成功的报道甚少。

## 1.2 林木体胚发生试验研究进展

### 1.2.1 林木体胚发生研究概述

植物的体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis), 是指单倍体或者二倍体的体细胞在特定条件下, 未经性细胞融合而通过与合子胚胎发生类似的途径, 发育出新个体的形态发生过程; 经体细胞胚胎发生形成的类似合子胚的结构称为胚状体(embryoid); 有些植物还可发生重复体细胞胚胎发生(repeated somatic embryogenesis)产生次生胚(Emons, 1994; 黄学林等, 1995)。植物体细胞胚胎发生技术研究开始于 20 世纪中期。1948 年, Curits 等在培养三色万带兰和兰属杂种胚的愈伤组织中首次发现了与正常胚相似的胚状体结构, 而对胚状体的认识过程则是在后来胡萝卜组织培养的大量工作中建立起来的。1958 年, Steward 和 Reinert 几乎同时在胡萝卜组织细胞悬浮培养中发现某些细胞能转变为形态和发育过程均与合子胚相似的胚状体, 并再生植株(Steward, et al, 1958; Reinert, 1959)。据不完全统计, 目前全世界约有 1 000 多种高等植物离体培养中陆续发现了类似现象, 从而使人们认识到体胚发生是植物离体培养除器官发生以外的又一基本途径。体细胞胚胎发生是植物界的普遍现象, 是植物细胞表达全能性的有力证明(崔凯

荣等,2000)。与器官发生相比,体细胞胚胎发生具有显著的特点:①具有两极性:在体细胞胚发生早期就具有胚根和胚芽两极,而不定芽或不定根都是单向极性。正由于此,胚状体的结构完整,成苗率高,成为人工种子的良好材料。②存在生理隔离:体细胞胚形成后与母体植物或外植体的维管束系统联系较少,很容易与原组织分离。体细胞胚处于相对独立的状态,可通过根端或类似胚柄的结构从外植体或愈伤组织中吸取营养,在适宜条件下长成一个独立的植株。③遗传的稳定性:胚状体起源于单细胞或者细胞团,在其产生和发育的过程中,一旦形成即通过了分化过程,结构即稳定,无需长时间的脱分化和再分化过程,细胞变异的频率较低,成苗率较高,遗传稳定性好。④发生数量大,增殖率高:植物胚状体形成后,在适宜的条件下还可再生胚状体,即形成大量次级胚状体,如石龙芮。⑤重演受精卵形态发生的特性:植物组织培养中形态发生的几种方式,虽然都是植物细胞全能性的具体表现,但体细胞胚胎发生途径是细胞全能性表达最完全的一种方式,它不仅表明植物体细胞具有全套遗传信息,而且重演了合子胚形态发生的进程(崔凯荣等,2000;刘庆星等,2002;周维燕,2001;谭文澄等,2001)。体细胞胚胎发生技术为植物品种改良、转基因受体和突变体筛选等生物事件提供良好的实验体系和模式(Zimmerman,1993),因此,深入研究具有重大的理论意义,有助于揭示细胞分化、发育、形态发生、代谢动态、合子胚发育、全能性表达、基因表达和调节控制等生命现象的奥妙;也具有重大的实践价值,既提高植物的质量和产量,又便于规模化经营管理和操作。体细胞胚胎发生技术的出现,给那些繁殖周期长、靠常规无性繁殖技术很难生根的林木、尤其是针叶树的快速繁殖以及产业化经营带来了曙光。

### 1.2.2 针叶树体细胞胚胎发生和植株再生进展

针叶树的体细胞胚胎发生研究始于20世纪70年代后期,80年代后期得到迅速发展并获得很大成功。继1985年Hakman等首次报道挪威云杉的未成熟合子胚形成体细胞胚并再生植株以来(Hakman, etal,1985),针叶树的体胚发生取得了可喜的进展。Durzan和他的同事们对松柏类植物愈伤组织和悬浮细胞的生长、代谢、分化和发育模式作了系统研究,他们在短叶松、白云杉、挪威云杉和北美黄杉的离体培养中观察到了胚性胚柄复合物(ESM: embryogenic suspensor mass),并在进一步的培养中,通过改变培养基组成,获得了大量体细胞胚和再生完整植株(Durzan, 1987;Gupta,etal,1986;1985,1987)。目前,据不完全统计,国内外已经从冷杉属(*Abies*)、落叶松属 (*Larix*)、云杉属(*Picea*)、松属(*Pinus*)、黄杉属(*Pseudasuga*)、金钱松属(*Pseudolarix*)和红杉属(*Sequoia*)等属超过40种植物中诱导了体细胞胚胎或体细胞胚并再生植株(表1),有些已经大规模应用于造林实

表1 针叶树种诱导体胚发生的部分名录

树种	外植体	结果	参考文献
北美短叶松( <i>Pinus banksiana</i> )	未成熟胚	田间试验	Park et al,1999
	成熟胚	田间试验	Park et al,1999
加勒比松( <i>Pinus caribaea</i> )	未成熟胚	植株再生	Laine et al,1990
	原生质体	植株再生	Laine et al,1990
	雌配子体	植株再生	Laine et al,1991
湿地松( <i>Pinus elliottii</i> )	未成熟胚	体胚发生	Jain et al,1989
	未成熟胚	植株再生	唐巍等,1997
	雌配子体	植株再生	Liao et al,1995
糖松( <i>Pinus lambertiana</i> )	未成熟胚	植株再生	Gupta and Durzan,1986
马尾松( <i>Pinus mazsoniana</i> )	成熟胚	植株再生	黄健秋等,1995
辐射松( <i>Pinus radiata</i> )	未成熟胚	植株再生	Chandler et al,1989
火炬松( <i>pinus taeda</i> )	雌配子体	田间试验	Gupta and Durzan,1987
	未成熟胚	田间试验	Gupta et al,1990
	成熟胚	植株再生	唐巍等,1998
挪威云杉( <i>Picea abies</i> )	未成熟胚	田间试验	Chalupa,1985
	成熟胚	田间试验	Gupta et al,1991
白云杉( <i>Picea glauca</i> )	针叶	体胚发生	Ruard et al,1992
	芽	胚性愈伤	Westcott et al,1994
	未成熟胚	田间试验	Attree et al,1990
	成熟胚	田间试验	Tremblay,1990
	未成熟胚	植株再生	Hakman et al,1987
	子叶	植株再生	Lelu et al,1990
	成熟胚	田间试验	Attree et al,1990
	成熟胚	田间试验	Attree et al,1990
	子叶	植株再生	Lelu et al,1990
	成熟胚	植株再生	杨金玲等,1997
白杆( <i>Picea meyeri</i> )	成熟胚	植株再生	杨金玲等,1997
青杆( <i>Picea willsonii</i> )	未成熟胚	植株再生	李映红等,1990
	雌配子体	植株再生	Laine and David,1990
白冷杉( <i>Abies alba</i> )	雌配子体	体胚发生	Schuller et al,1989
	未成熟胚	植株再生	Schuller et al,1989
	成熟胚	植株再生	Hristoforglu et a,1992
华北落叶松( <i>Larix incipis-Rupprechtii</i> )	未成熟胚	田间试验	齐力旺等,2000
日本落叶松( <i>Larix leptolepis</i> )	未成熟胚	植株再生	吕守芳等,2005
红杉( <i>Sequoia sempervirens</i> )	成熟胚	植株再生	Bourgkard et al,1988
	子叶	植株再生	Bourgkard et al,1988
	下胚轴	植株再生	Bourgkard et al,1988

践,如美国的惠好公司、国际纸业公司、维斯瓦库公司、新西兰林业研究中心和意大利的一些公司已经分别将火炬松、辐射松及北美黄杉等树种体细胞胚胎诱导和植株再生用于生产,稳定的基因转移及表达调控在这些树种上也获成功,新西兰已形成了年产 200 万株辐射松体细胞植株能力(Jain,etal,1988;Tautorus,etal,1991;Beewar,1990;Thompson,etal,1992;LELU,ETAL,1994;Finer,etal,1989;Attree,1991;Ford,etal,2000;Bonga,etal,1995;Laine,etal,1992)。

国内针叶树体细胞胚胎发生技术研究虽然稍迟,但也取得了可喜的进展。1990 年,李映红和郭仲琛从青杆的未成熟合子胚中获得了体细胞胚的再生植株(李映红等,1990)。1995 年,黄健秋和卫志明从马尾松和云南松的成熟合子胚上成功诱导出体细胞胚(黄健秋等,1995a; 1995b)。唐巍等以火炬松的成熟合子胚为外植体,建立了火炬松的体细胞胚胎发生与植株再生体系(唐巍等, 997)。齐力旺等系统研究了落叶松体细胞胚胎发生过程,建立了高效的落叶松体细胞胚胎发生及植株再生系统,并已进行田间试验(齐力旺等, 2000; 2004)。申晓辉等研究了红松、油松及美国五针松未成熟胚的体细胞胚胎发生过程,并获得大量成熟体胚(申晓辉等, 2002)。席梦利等利用杉木成熟胚为材料开展了杉木体胚试验(席梦利等, 2005)。

### 1.2.3 针叶树体细胞胚胎发生及其影响因素

**1.2.3.1 针叶树体细胞胚胎发生** 对于针叶树种来讲,体细胞胚胎发生是一种非常重要的无性繁殖方式。而针叶树的体胚发生和植株再生是植物组织培养研究中难度较大的一个领域,其体细胞胚胎发生要困难得多,胚性愈伤组织的诱导率较低,且大多来自于幼嫩的组织(如未成熟合子胚、子叶等);体细胞胚的成熟和萌发严重依赖于外植体的基因型;体细胞胚的诱导率和转换率低。因此,针叶树体胚发生的前景广阔,有待进一步深入研究。从已体胚发生成功的树种来看,针叶树体细胞胚胎发生过程相似,主要包括 4 个步骤:胚性愈伤组织的诱导;增殖和保持;胚的成熟;胚的萌发和转换成再生植株(江波等, 2004)。一是胚性愈伤组织的诱导,胚性愈伤组织的获得是植物体细胞胚胎发生的首要一步。愈伤组织的形成(dedifferentiation)一个重要的前提就是要脱离整体的约束,进行离体培养;当然也离不开外界的刺激,尤其是添加的外源植物生长调节剂对这一转化过程中的基因差异表达起调节作用(刘庆星等, 2002; 崔凯荣等, 2000)。长期以来,大多数的研究主要集中在体细胞胚的成熟,但是过去几年里,通过对几个属体胚发生的研究,发现体细胞胚胎发生早期阶段的调整对于整个发育过程也起着很重要的作用。研究表明,针叶树愈伤组织的诱导一般在含有较高浓度的生长素和较高浓度的细胞分裂素的固体培养基上进行,其诱导率与用外植体的基因型、生理状态、发育阶段及预处理、

培养基的组成、植物生长调节剂种类和浓度、培养条件等有关。1995 年,黄健秋等在研究马尾松成熟合子胚的体细胞胚胎发生和植株再生时得出:福建马尾松、浙江马尾松及湖北马尾松三种基因型在胚性愈伤组织的诱导频率上存在很大的差异,分别为 45.3%、17.4%、19.8%(黄健秋等,1995a)。二是胚性愈伤组织的保持和增殖,研究表明,针叶树离体培养所得的胚性愈伤组织在半年之内的增殖培养中,保持较旺盛的分化能力,处高频率体胚发生时期,9 个月以后分化能力有下降的趋势,一年后则明显降低,严重的可能完全丧失体细胞胚胎发生能力。所以,保持胚性愈伤组织的高频率、稳定的体细胞胚胎发生能力是持续体胚发生的一个关键环节。胚性愈伤组织的维持与增殖通常是在与愈伤组织的诱导培养基组成成分相同但降低了植物生长调节剂浓度的固体或液体培养基上进行。Fischer-Iglesias 和 Nauhaus 提出了生长素在合子胚的发育过程中的重要性。向处于合子胚发育中的球形胚阶段甘蓝型油菜加入生长素转运抑制剂 TIBA 时,会阻止对称性的形成,进而抑制苗顶端分生组织的形成(黄健秋等,1994)。一般来说,2,4-D 对于胚性愈伤组织的诱导是不可缺少的,但在胚性愈伤组织增殖阶段,应该及时去掉或者降低或者用 NAA 代替 2,4-D,这样有利于以后体胚的发生,因为长时间培养在含高浓度的 2,4-D 的培养基上易造成体胚成熟能力的丧失(Kim,etal,1997)。在增殖阶段中,胚性胚柄团向体细胞胚转化会出现一个很重要的生物事件——细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD),及时排除多余的或者损伤的细胞,这对于生物体正常功能行使非常必要(Claudio,etal,2005)。Filonova 等在挪威云杉(*Picea abies* L. Karst.)体细胞胚胎发生过程中,发现了两次连续的程序性死亡过程(Bozhkov,etal,2002)。第一次发生在 PEMs 开始形成体胚胚头(embryo proper),某些细胞发生降解,这对于体胚的发育成熟非常关键,突变研究表明,完全或部分中断死亡程序将会导致未成熟胚的死亡(White,etal,1994)。第二次发生在早期胚胎形成时期的某些胚柄细胞(embryo-suspensor cells)的程序性死亡,这一过程的结果肯定与体胚的成熟有着紧密的联系。三是体胚的发育和成熟,一般在增殖培养基培养一段时间后,培养物就要转入成熟培养基进行体细胞胚的诱导和发育。诱导体胚成熟培养基适当与否是整个试验成败的关键,而使胚性组织增殖的培养基却抑制体胚成熟(Filonova,etal,2000)。因此,要使体胚成熟,需将胚性愈伤组织从高植物生长调节剂含量的诱导培养基转移到低浓度或完全去除以前植物生长调节剂或添加其它植物生长调节剂的基本培养基上,抑制胚性愈伤组织的继续增殖,如用脱落酸(abscisic acid, ABA)代替增殖培养基中的生长素和细胞分裂素。一般认为,ABA 的作用是防止裂生多胚现象,防止畸形胚的形成,促使胚胎单个化并进一步发育成熟(崔荣凯等,2000)。此外,研究表明,适当地提高培养基的渗透压可明显促进体胚的形成。糖既是能源物质,



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库